

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 33/00	AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/15311 (43) Date de publication internationale: 1er mai 1997 (01.05.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01610 (22) Date de dépôt international: 15 octobre 1996 (15.10.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/12345 20 octobre 1995 (20.10.95) FR	(81) Etats désignés: AU, JP, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
<p>(71) Déposant: L'AIR LIQUIDE, SOCIÉTÉ ANONYME POUR L'ÉTUDE ET L'EXPLOITATION DES PROCÉDÉS GEORGES CLAUDE [FR/FR]; 75, quai d'Orsay, F-75321 Paris Cédex 07 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs: BRIEND, Robert; 2, rue Gauguin, F-78340 Les Clayes-sous-Bois (FR). RENAUDIN, Marie-Hélène; 6, rue François-Mouthon, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: L'AIR LIQUIDE, SOCIÉTÉ ANONYME POUR L'ÉTUDE ET L'EXPLOITATION DES PROCÉDÉS GEORGES CLAUDE; 75, quai d'Orsay, F-75321 Paris (FR).</p>		
<p>(54) Title: NITROGEN MONOXIDE COMPOSITION FOR USE AS A DRUG</p> <p>(54) Titre: COMPOSITION A BASE DE MONOXYDE D'AZOTE EN TANT QUE MÉDICAMENT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The use of a gaseous composition containing nitrogen monoxide (NO) and carbon dioxide (CO₂) for preparing a drug useful for the intravascular treatment or prevention of ischaemia is disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne l'utilisation d'une composition gazeuse contenant du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde de carbone (CO₂) pour la fabrication d'un médicament gazeux destiné au traitement ou à la prophylaxie par voie intravasculaire de l'ischémie.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

COMPOSITION A BASE DE MONOXYDE D'AZOTE EN TANT QUE
MEDICAMENT

La présente invention concerne l'utilisation d'une composition gazeuse stable à base de monoxyde d'azote (NO) et de dioxyde de carbone (CO₂) pour la fabrication d'un médicament gazeux destiné au traitement ou à la prophylaxie par voie intra-vasculaire de l'ischémie, et, en particulier de l'embolie.

Le monoxyde d'azote est produit naturellement chez le mammifère par une enzyme, la NO-synthase, laquelle est exprimée de façon constitutive dans les cellules endothéliales, dans les plaquettes et dans le système nerveux central et périphérique. Une autre forme de NO-synthase calcium-indépendante, peut être induite par différents stimuli (notamment des liposaccharides) dans de nombreuses cellules telles que les macrophages, les lymphocytes, les cellules myocardiques, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

Le monoxyde d'azote est un messenger biologique important chez les mammifères et cette molécule joue un rôle déterminant dans le contrôle local de l'hémodynamique.

On a pu mettre en évidence la libération de NO par les cellules endothéliales en cas de variations du débit sanguin. Le monoxyde d'azote apparaît notamment comme une composante majeure de l'adaptation physiologique du diamètre vasculaire à la perfusion sanguine : ainsi au niveau coronaire, l'hypérémie réactive est atténuée de façon notoire. Inversement, une augmentation chronique du débit sanguin produite par une fistule artérioveineuse augmente les relaxations dépendantes de l'endothélium.

La capacité du monoxyde d'azote produit au niveau de la paroi vasculaire et dans les tissus avoisinants à réguler de façon précise le tonus

vasculaire par adaptation du débit sanguin est remarquable. De même, on a émis l'hypothèse que le NO libéré lors de l'activité neuronale pourrait réguler le tonus de la microcirculation cérébrale, couplant ainsi l'activité et le débit sanguin cérébral. On rappellera également le rôle de NO dans la régulation de la prolifération du muscle lisse vasculaire ~~laquelle est un facteur déterminant de la compliance~~ vasculaire.

10 Le monoxyde d'azote contrôle par ailleurs la perméabilité veinulaire post-capillaire.

Le monoxyde d'azote participe aussi à des mécanismes de régulation hormonale, au niveau du rein en inhibant la libération de rénine, au niveau 15 cardio-vasculaire, en antagonisant la libération du facteur natriurétique (ANF).

Enfin, in vivo, l'activation plaquettaire est sous le contrôle permanent du monoxyde d'azote endothélial, et dans un moindre degré sous celui de la propre NO synthase plaquettaire. Lors de 20 l'agrégation, les plaquettes libèrent des nucléotides (ATP, ADP), de la sérotonine, du PAF, du thromboxane A2 et de la vasopressine; elles peuvent aussi initier la cascade de la coagulation en libérant de la 25 thrombine. En réponse à l'ATP, l'ADP, la sérotonine, le PAF et la thrombine, les cellules endothéliales libèrent du NO et de la prostacycline qui agissent en synergie pour prévenir et contrer le processus d'agrégation plaquettaire.

30 La diminution anormale du taux de monoxyde d'azote observée dans le cas de nombreuses pathologies semble confirmer l'importance du rôle joué par celui-ci dans l'organisme. Une telle diminution est caractéristique de l'hypertension, de 35 l'hypercholestérolémie, de l'athérosclérose et du diabète.

De même, une réduction très précoce de la libération basale de NO serait à l'origine des troubles liés à la reperfusion de territoires ischémiés, tels que la thrombose coronaire et le vasospasme.

Sur la base de ces diverses constatations, divers agents vasodilatateurs ont été mis au point à ce jour : ces substances connues sous la désignation de nitrovasodilatateurs produisent du NO in vivo et suppléent ainsi à un défaut de NO endogène. On peut citer, par exemple, la molsidomine ou le nitroprussiate de sodium, lesquels permettent de prévenir les phénomènes d'adhésion et d'agrégation plaquettaire.

De façon à pallier une production insuffisante de NO, on a, de même, proposé l'administration de L-arginine ou d'analogues de la L-arginine, la L-arginine intervenant directement dans la biosynthèse du monoxyde d'azote, en tant que substrat de la NO-synthase.

Au vu de la contribution significative du monoxyde d'azote au maintien d'une basse pression au niveau de la circulation pulmonaire et de l'importance de l'effet vasodilatateur local résultant, on a, par ailleurs, suggéré l'administration directe de NO par voie inhalée dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire aiguë. Les nombreuses recherches réalisées en ce sens ont démontré l'efficacité thérapeutique d'un mélange gazeux de monoxyde d'azote et d'azote inhalé à des doses comprises entre 1 et 20 ppm de NO sur des patients souffrant de détresse respiratoire aiguë : une réduction de l'hypertension artérielle pulmonaire éventuellement accompagnée d'une amélioration des rapports ventilation-perfusion par baisse du shunt intrapulmonaire sont en effet observées.

Néanmoins, ce type d'administration par voie inhalée présente l'inconvénient majeur d'entraîner la formation de NO_2 par réaction du NO inhalé avec l'oxygène présent au niveau des alvéoles pulmonaires.

5 Or, le dioxyde d'azote est une substance hautement toxique pour le poumon. Un autre désavantage de la méthode est lié à la nécessité de réaliser le mélange ~~constitué de monoxyde d'azote, d'azote et d'oxygène~~ de façon extemporanée, le temps de contact entre NO et O_2 devant être le plus court possible.

10 De plus, l'administration par voie inhalée limite de toute évidence l'action du monoxyde d'azote exogène aux zones ventilées du poumon.

15 Une injection intra-vasculaire du mélange utilisé constitué d'azote et de NO n'est en effet pas envisageable dans la mesure où elle entraînerait l'embolie gazeuse.

C'est dans ce contexte que la présente invention a été réalisée.

20 L'invention concerne alors l'utilisation d'une composition gazeuse contenant du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde de carbone (CO_2) pour la fabrication d'un médicament gazeux destiné au traitement ou à la prophylaxie par voie intra-vasculaire de l'ischémie, chez l'homme ou l'animal.

25 Plus précisément, l'invention concerne l'utilisation d'une composition gazeuse contenant du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde de carbone (CO_2) pour la fabrication d'un médicament gazeux destiné
30 au traitement ou à la prophylaxie par voie intra-vasculaire de l'embolie, chez l'homme ou l'animal.

Dans le cadre de la présente invention:

- le terme ischémie désigne un arrêt total ou partiel de la circulation sanguine dans une zone
35 localisée de l'organisme humain ou animal;

- et le terme embolie désigne, quant à lui, une oblitération d'un vaisseau sanguin par un caillot ou un corps étranger véhiculé par le sang jusqu'au lieu où le calibre du vaisseau sanguin est insuffisant pour permettre son passage.

L'embolie est donc une forme particulière d'ischémie.

Le médicament gazeux de l'invention est, de préférence, constituée du seul mélange de gaz carbonique et de monoxyde d'azote; toutefois, l'addition d'au moins un gaz dans le groupe formé par le xénon, le krypton, le protoxyde d'azote et leurs mélanges, audit mélange de CO₂ et de NO est également envisageable dans le cadre de l'invention.

La concentration de NO dans le mélange gazeux NO + CO₂ est une concentration efficace, de préférence comprise entre 1 et 100 ppm. Une concentration inférieure à 1 ppm n'est pas souhaitable dans la mesure où une concentration minimale de 2 nM de NO est détectée dans le plasma sanguin d'un mammifère sain. Une concentration supérieure à 100 ppm entraîne une disparition progressive de l'effet thérapeutique. Les raisons du peu d'activité observée à de telles concentrations sont encore inconnues, mais pourraient être liées à une toxicité locale ou éventuellement à la saturation des récepteurs du monoxyde d'azote.

Selon un mode de réalisation préféré, la concentration de NO dans le mélange médicamenteux est comprise entre 15 et 30 ppm.

La stabilité du médicament gazeux de l'invention permet son stockage sous pression dans des conditionnements classiques du type bouteilles en acier ou alliage léger à base d'aluminium.

De façon à éviter tout risque de contamination, on optera avantageusement pour des bouteilles en alliage léger à base d'aluminium. Les conditions de

stockage préférées assurant une stabilité supérieure à 2 ans sont une température comprise entre 15 et 30°C, de préférence 20 et 25°C, et une pression comprise entre 20 et 30 bars.

5 Le médicament gazeux de l'invention est administrable par voie intra-vasculaire, sans risque d'embolie gazeuse, par exemple par voie intra-
artérielle, par voie intra-cardiaque ou par voie intra-veineuse.

10 Dans le cas d'une administration intra-vasculaire, on aura préférablement recours à un cathéter introduit au niveau du vaisseau sanguin traité. Les cathéters utilisables à cet effet sont ceux habituellement employés dans la technique. La
15 nature du matériau formant le cathéter n'est pas critique en soi; on recommande néanmoins un matériau souple, tel que le silastène. Son implantation dans le vaisseau sanguin est réalisée de façon connue en soi, par exemple, après anesthésie locale et
20 incision. Par commodité le cathéter peut être maintenu par ligature à la suite de quoi l'incision peut être refermée ou non.

Lors de l'injection, on prendra les précautions nécessaires habituelles de façon à éviter
25 l'agrégation plaquettaire et la coagulation au niveau de l'orifice.

En ce sens, on pourra avantageusement procéder à l'administration d'une solution physiologique héparinée avant et après injection du médicament
30 gazeux de l'invention.

Concernant le débit d'injection, l'homme du métier pourra facilement le déterminer, étant entendu qu'une solubilisation immédiate du médicament gazeux au fur et à mesure de son administration est
35 des plus souhaitables : ce faisant, on évitera la formation de bulles de gaz. Chez l'homme un débit

inférieur à 20 ml/mn et, de préférence, inférieur à 10 ml/mn, mieux encore 8 ml/mn conduira à une efficacité optimale. Ces chiffres n'entendent cependant nullement limiter l'invention. Il est clair
5 en effet, que le débit d'injection est fonction du débit sanguin du vaisseau traité.

La quantité de composition médicamenteuse devant être administrée dépend, quant à elle, de l'âge du patient, de la gravité de l'affection dont il souffre
10 et de la concentration en NO de la composition gazeuse injectée.

Selon l'invention, une intervention au niveau d'un vaisseau artériel serait préférée. En effet, on a pu constater que dans les artères, la concentration
15 en oxyhémoglobine est telle que la fixation de monoxyde d'azote sur l'hémoglobine est nettement défavorisée. De ce fait, la formation de méthémoglobine par liaison du monoxyde d'azote avec l'hémoglobine n'aurait lieu qu'en quantité
20 insuffisante pour provoquer une éventuelle inhibition de l'effet thérapeutique du monoxyde d'azote et notamment de son effet vasodilatateur et anti-agrégant plaquettaire.

De récents travaux ont montré que le monoxyde d'azote peut aussi réagir avec des protéines, telle
25 l'albumine, pour former des S-nitrosothiols, dont la durée de vie est plus longue que celle du NO libre. Ces espèces présentant une activité biologique comparable à celle du NO libre, on comprend que
30 l'efficacité des compositions médicamenteuses de l'invention ne s'en trouve pas diminuée.

Les compositions médicamenteuses de l'invention conviennent parfaitement au traitement de l'ischémie et de l'embolie lorsque administrées par injection
35 intra-vasculaire: intra-artérielle, intra-cardiaque ou intra-veineuse.

Les exemples 1 à 3 qui suivent illustrent la stabilité des compositions de l'invention, ainsi que leur utilité thérapeutique, en référence aux Figures 1 et 2 annexées.

5

EXEMPLE 1

Divers mélanges de monoxyde d'azote et de gaz carbonique ont été préparés et conditionnés dans des
10 bouteilles de type B5 en alliage léger, à base d'aluminium, commercialisées par S.M. GERZAT sous une pression de 24 bars. Dans ces mélanges, la concentration initiale du monoxyde d'azote a été
15 fixée à 20 ppm. La stabilité de la concentration en NO a été étudiée pour trois bouteilles conservées à température ambiante sur une période de 16 mois.

La valeur de la concentration en NO est mesurée par un analyseur à chimiluminescence dans la gamme de
0 à 100 ppm, calibré avant chaque mesure à l'aide
20 d'un mélange étalon NO/N₂ à 90 ppm. L'analyseur à chimiluminescence utilisé est le TOPAZE 2020 fabriqué par COSMA.

A l'issue d'une période de 16 mois, aucune décomposition du monoxyde d'azote dans les mélanges
25 NO/CO₂ conservés à température ambiante n'a pu être détectée. De fait, les seules fluctuations mesurées dans la valeur de la concentration en NO restent inférieures à la précision de l'analyse.

Ces résultats confirment la stabilité des
30 compositions médicamenteuses de l'invention.

EXEMPLE 2

L'utilité thérapeutique des compositions
35 médicamenteuses de l'invention a été démontrée sur un modèle expérimental. Plus précisément, cet exemple

5 vise à mettre en évidence les propriétés vasodilatatrices in vivo de compositions gazeuses constituées d'un mélange de CO₂ et de NO au niveau coronarien sur un modèle d'ischémie myocardique multifocale chez le rat.

L'essai a été réalisé sur des rats Wistar mâles d'un poids moyen de 260/280 g, âgés de trois mois.

10 Pour l'administration des compositions de l'invention, on a procédé à la mise en place de cathéters souples débouchant dans le ventricule gauche.

Les rats sont mis à jeûn la veille au soir de l'expérimentation, pendant 20 heures.

15 Une anesthésie au Chloral est pratiquée par administration intrapéritonéale de 360 mg/kg d'anesthésique. La carotide gauche est dégagée et clampée sans lésions des plans musculaires. Un cathéter souple en silastène rempli de sérum physiologique hépariné à 2% est introduit par voie
20 rétrograde jusqu'au ventricule cardiaque gauche (environ 5 cm de cathéter). Le cathéter est maintenu en place par deux fils de ligature et est ressorti en passant sous la peau au niveau de la partie dorsale de la tête. L'incision est refermée. L'animal se
25 réveille de son anesthésie en 60 à 90 minutes. La perméabilité du cathéter est vérifiée et du sérum physiologique hépariné reste dans le cathéter.

Trois heures après le réveil, l'activité spontanée des animaux est redevenue normale.
30 L'extrémité du cathéter est prolongée avec un cathéter classique (Biotrol) de 600 µ de diamètre intérieur d'une longueur de 30 cm pour les injections ultérieures.

35 Diverses expériences sont réalisées sur un groupe de rats sains et sur un groupe de rats embolisés.

Le protocole opératoire suivi afin d'induire l'ischémie myocardique multifocale est le suivant.

L'embolisation est provoquée par l'administration chez un rat sain de 0,4 ml de
5 dextran à 20% contenant 40000 microsphères d'albumine de 50 μ microsonnées et maintenues en suspension par agitation. L'injection est réalisée en une minute par
~~l'intermédiaire du cathéter intra-ventriculaire.~~

0,2 ml de sérum physiologique sont alors
10 administrés par la même voie pour pousser l'ensemble des microsphères dans le ventricule. Ces microsphères se répartissent dans l'organisme en fonction des fractions de débit cardiaque et en particulier dans le myocarde. Chaque microsphère obture une artériole
15 et entraîne une microembolisation. Après l'administration des microsphères, un laps de temps de 30 minutes est respecté pour le développement de l'ischémie avant l'apparition de l'oedème. Les rats de l'autre moitié du lot ne sont pas embolisés.

20 Le cathéter est alors connecté à un régulateur de débit gazeux relié à une source d'approvisionnement du gaz devant être injecté.

Du vert d'indocyanine (10 μ l) est placé dans le cathéter afin de visualiser le déplacement du sérum
25 physiologique. Le régulateur de débit gazeux est ouvert et le gaz est poussé à débit constant dans le cathéter pendant une minute.

Après ce temps d'une minute, le cathéter est déconnecté du régulateur, et le reste du gaz se trouvant dans le cathéter est poussé par 0,2 ml de
30 sérum physiologique.

Immédiatement (10 secondes) après une solution d'isopropyl iodo amphétamine (IAMP) marquée à l'iode 125 sous un volume de 0,2 ml est administrée par la
35 même voie et poussée par 0,2 ml de sérum physiologique. 5 minutes après cette dernière

administration, les rats sont sacrifiés par décapitation. Du sang est prélevé sur héparine et rapidement centrifugé pour isoler le plasma et les hématies. Environ 200 mg de foie sont prélevés. Le
5 coeur est dégagé et séparé en endo et épicarde par dissection.

La radioactivité des quatre tissus, plasma, foie, épi et endocarde, est alors comptée par spectrométrie gamma (Appareil Intertechnique) en
10 réglant le canal A sur le pic de l'iode 125.

Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de coups par minute et par gramme de tissus.

La radioactivité du plasma nous permet de calculer un débit sanguin dans chaque tissu compte-
15 tenu du débit cardiaque moyen qui est de 180 ml/mn chez le rat.

Les débits tissulaires sont exprimés en ml/mn/100 g de tissu.

20 EXEMPLE 2A

Une première série d'expérience a été réalisée en suivant le protocole général exposé ci-dessus à partir de 12 rats, dont 6 sains et 6 embolisés, sans
25 injection de gaz.

Les valeurs témoins correspondantes des débits sanguins ont été rapportées dans le tableau A ci-dessous:

TABLEAU A

	Débits sanguins (ml/mn/100 g)	
	Rats témoins	Rats embolisés
Endocarde	28,7 +/-1,4	20,5 +/-1,1**
Epicarde	24,6 +/-1,1	23,3 +/-0,8
R = Endo/Epi	1,16 +/-0,15	0,87 +/-0,02**
Foie	73 +/-3	68 +/-3

5 n = 6, m +/- ESM, ** p = 0,01 (test t de Student) comparaison entre embolisés ou non.

10 Le débit basal de l'endocarde est supérieur à celui de l'épicarde d'où un rapport endocarde sur épicarde supérieur à 1. L'embolisation porte plus sur l'endocarde que sur l'épicarde d'où une inversion significative du rapport. L'embolisation entraîne une diminution significative des débits cardiaques alors qu'au niveau du foie, organe pris comme référence, la diminution observée est très faible.

15

EXEMPLE 2B

20 Une deuxième série d'expériences a été réalisée en suivant le protocole général exposé à l'exemple 2 à partir d'un groupe de 6 rats sains auxquels on administre des mélanges de NO et CO₂.

25 Le NO a été perfusé pendant une minute aux doses de 20 ppm avec un débit de 0,4; 0,6 respectivement 0,8 ml/mn et de 200 ppm avec un débit de 0,6 ml/mn.

Le tableau B ci-dessus rapporte l'ensemble des résultats obtenus :

TABLEAU B

Débits sanguins (ml/mn/100 g)				
	C1=20 ppm d2=0,4 ml/mn	C1=20 ppm d2=0,6 ml/mn	C1=20 ppm d2=0,8 ml/mn	C1=200 ppm d2=0,6 ml/mn
Endocarde	44,8 +/-1,0	51,2 +/-1,2	55,8 +/-1,4	34,5 +/-1,4
Epicarde	48,2 +/-1,5	57,8 +/-1,7	64,2 +/-1,2	36,7 +/-1,6
R=Endo/Epi	0,93+/-0,02	0,89+/-0,01	0,87+/-0,01	0,94+/-0,01
Foie	79+/-4	78+/-4	74+/-2	66+/- 6

5

n = 6, m+/-ESM

1 : C représente la concentration de NO dans le gaz administré.

2 : d représente le débit du gaz au cours de l'injection.

10

Les débits au niveau de l'endocarde et de l'épicarde sont significativement augmentés par les faibles doses de NO.

15

La Figure 1 annexée, tracée à partir des résultats obtenus aux exemples 2A et 2B, rapporte les variations des débits sanguins au niveau de l'endocarde et de l'épicarde en fonction du débit de perfusion chez des rats sains. Il résulte clairement de cette courbe que le débit sanguin tissulaire augmente proportionnellement au débit de perfusion, c'est-à-dire à la quantité totale de NO injectée.

20

Néanmoins, on constate une nette diminution des débits sanguins avec une augmentation importante (d'un facteur 10) de la concentration en NO dans le gaz administré.

25

EXEMPLE 2C

Une troisième série d'expériences a été réalisée en suivant le protocole général exposé à l'exemple 2 à partir d'un groupe de 6 rats embolisés auxquels on administre des mélanges de NO et CO₂.

Le NO a été perfusé pendant une minute aux doses de 20 ppm avec un débit de 0,4; 0,6; respectivement 0,8 ml/mn et de 200 ppm avec un débit de 0,6 ml/mn.

TABLEAU C

Débits sanguins (ml/mn/100 g)				
	C1=20 ppm d2=0,4 ml/mn	C1=20 ppm d2=0,6 ml/mn	C1=20 ppm d2=0,8 ml/mn	C1=200 ppm d2=0,6 ml/mn
Endocarde	42,2 +/-1,3	46,2 +/-1,5	51,8 +/-1,5	38,0 +/-1,8
Epicarde	41,2 +/-1,4	43,2 +/-1,0	44,2 +/-1,3	38,8 +/-2,0
R=Endo/Epi	1,03+/-0,03	1,07+/-0,02	1,17+/-0,03	0,98+/-0,01
Foie	69+/-3	68+/-3	67+/-3	68+/-3

n = 6, m+/-ESM

1 : C représente la concentration de NO dans le gaz administré.

2 : d représente le débit de gaz au cours de l'injection.

En fonction de la dose administrée, le NO entraîne une augmentation du débit au niveau de l'endocarde. Dans une plus faible mesure, un effet identique est observé au niveau de l'épicarde. Ceci se traduit par un rétablissement du rapport R comme chez les témoins.

La Figure 2 rassemble les résultats obtenus à cet exemple et ceux de l'exemple 2A mettant en jeu

des animaux embolisés n'ayant subi aucune administration de gaz. Plus précisément, la courbe de la Figure 2 retrace les variations des débits sanguins au niveau de l'épicarde et de l'endocarde en fonction du débit de gaz injecté.

En fait par rapport aux animaux non embolisés, le NO aux doses faibles, entraîne une redistribution des débits vers l'endocarde, région la plus ischémisée. Cet effet est associé à l'augmentation globale du débit.

Le NO redistribue donc le sang vers les régions les plus embolisées, d'où l'utilité des compositions de l'invention dans le traitement d'infarctus aigus.

Cette expérience met par ailleurs en évidence l'absence d'activité du NO administré au niveau hépatique confirmant l'action locale du monoxyde d'azote. De plus, on constate à nouveau qu'à une concentration trop élevée (200 ppm) du NO dans le gaz injecté, l'effet thérapeutique se trouve diminué.

Après chaque administration de gaz (exemples 2B et 2C), du sang de chaque rat a été prélevé. Les hématies séparées du plasma ont été hémolysées et le pourcentage de méthémoglobine par rapport à l'hémoglobine a été déterminé par spectrométrie UV sur un appareil UNICAM. Aucune modification du taux de méthémoglobine n'a pu être mise en évidence par rapport à un échantillon de sang de rat témoin.

EXEMPLE 3

Cet exemple est une étude de la toxicité éventuelle du NO gazeux administré par voie intracardiaque. En utilisant le même protocole d'administration qu'exposé à l'exemple 2A on a procédé aux trois expériences suivantes:

EXEMPLE 3A

Deux rats ont reçu une perfusion de NO + CO₂ à une concentration de 200 ppm en NO et un débit de 0,8 ml/mn pendant 15 minutes. Des troubles passagers du comportement ont été observés pendant et à la fin de la perfusion; puis les rats ont retrouvé un comportement normal (aucune mortalité après huit jours).

10

EXEMPLE 3B

Quatre rats ont reçu une perfusion de NO + CO₂ à une concentration de 200 ppm et un débit de 1,2 ml/mn pendant 15 minutes. Après des convulsions, les animaux développent une paralysie du train postérieur. Deux des 4 animaux sont morts dans l'heure qui suit la fin de la perfusion. Les deux autres survivent mais restent partiellement paralysés.

20

EXEMPLE 3C

Deux rats reçoivent une perfusion de CO₂ à un débit de 1,2 ml/mn pendant 15 minutes. Une paralysie du train postérieur est observée sans mortalité.

25

La perfusion de NO + CO₂ à une concentration de 200 ppm et un débit de 1,2 ml/mn pendant 15 minutes entraîne une mortalité de 50% des animaux alors qu'à un débit de 0,8 ml/mn il n'y a pas de mortalité. IL semble cependant que la vitesse de perfusion soit déterminante puisque le CO₂ se révèle presque aussi toxique.

30

Ainsi, il apparaît que les doses toxiques sont nettement plus importantes que les doses actives, ce qui permet une utilisation thérapeutique des compositions de l'invention sans risque majeur.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une composition gazeuse contenant du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde de carbone (CO₂) pour la fabrication d'un médicament gazeux destiné au traitement ou à la prophylaxie par voie intra-vasculaire de l'ischémie.

2. Utilisation d'une composition gazeuse contenant du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde de carbone (CO₂) pour la fabrication d'un médicament gazeux destiné au traitement ou à la prophylaxie par voie intravasculaire de l'embolie.

3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit médicament gazeux comprend, en outre, au moins un gaz choisi dans le groupe formé par le protoxyde d'azote, le xénon, le krypton et leurs mélanges.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit médicament gazeux contient une concentration efficace de NO.

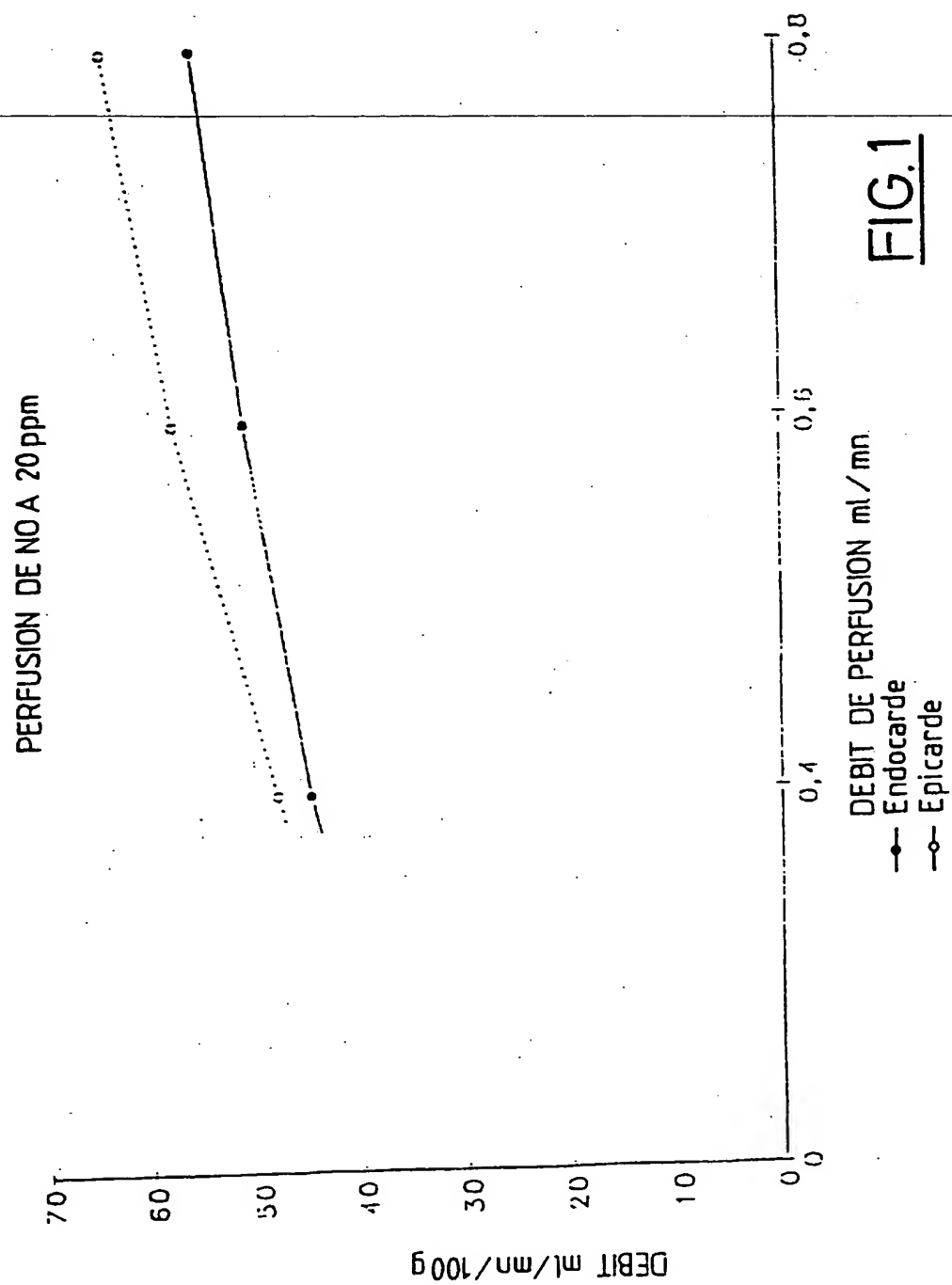
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit médicament gazeux contient une concentration de NO comprise entre 1 et 100 ppm.

6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit médicament gazeux contient une concentration de NO comprise entre 15 et 30 ppm.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la voie intravasculaire est la voie intra-artérielle.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la voie intravasculaire est la voie intra-cardiaque.

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la voie intravasculaire est la voie intra-veineuse.



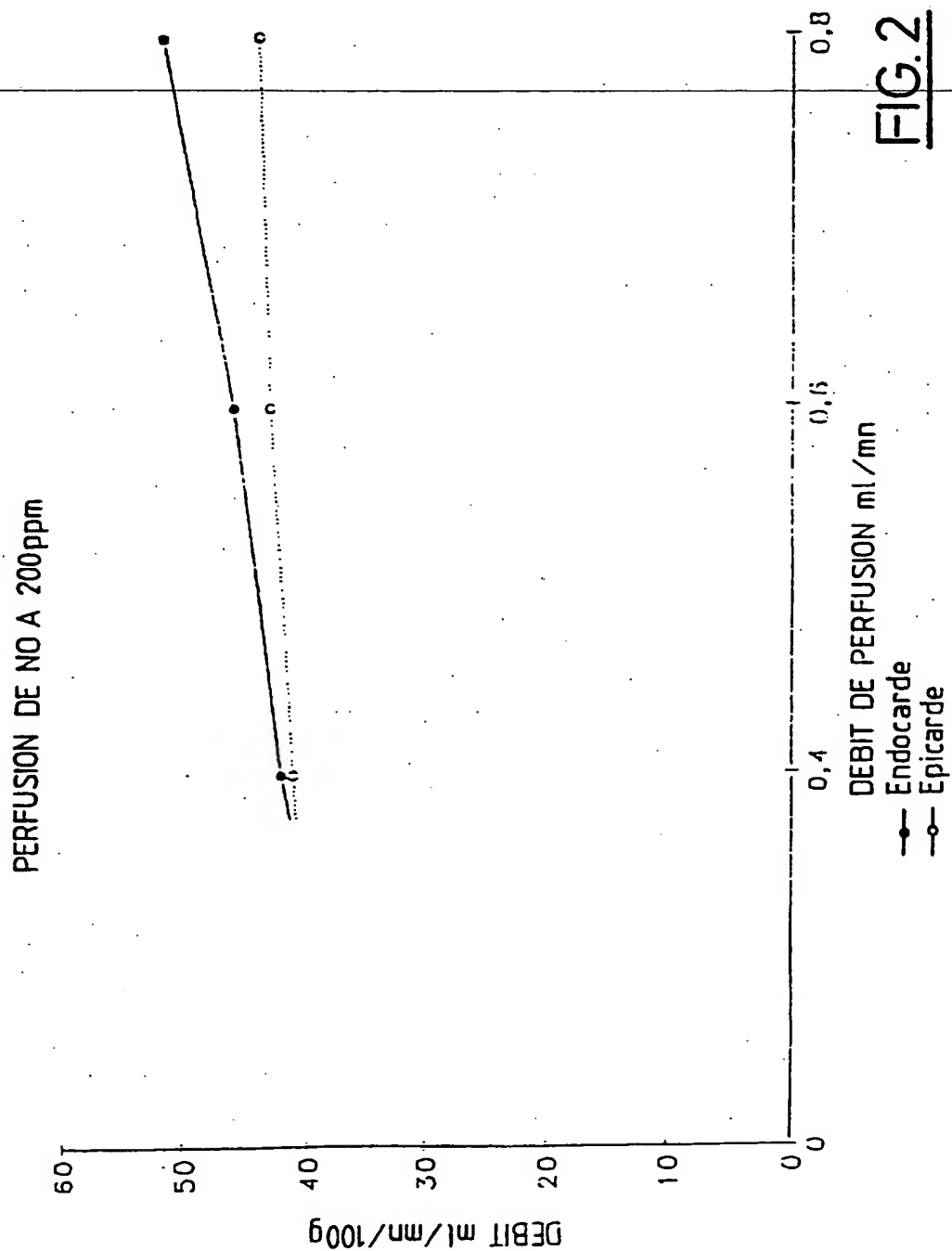


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/FR 96/01610A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 00180 A (GEN HOSPITAL CORP) 6 January 1994 see page 6, line 24-32 see page 13, line 2-7 ---	1-9
A	WO 92 10228 A (GEN HOSPITAL CORP) 25 June 1992 see page 6, line 14 - page 9, line 13 ---	1-9
A	WO 94 22499 A (BRIGHAM AND WOMENS HOSPITAL) 13 October 1994 see page 4, paragraph 1 -----	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 1997

Date of mailing of the international search report

21.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Leherte, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01610

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9400180	06-01-94	US-A- 5536241 AU-A- 4651693	16-07-96 24-01-94
WO-A-9210228	25-06-92	AU-B- 657726 AU-A- 9149891 CA-A- 2097823 DE-T- 560928 EP-A- 0560928 ES-T- 2082732 JP-T- 6504778 US-A- 5536241 US-A- 5570683 US-A- 5485827	23-03-95 08-07-92 06-06-92 22-09-94 22-09-93 01-04-96 02-06-94 16-07-96 05-11-96 23-01-96
WO-A-9422499	13-10-94	US-A- 5427797 AU-A- 6496894 CA-A- 2159915 EP-A- 0692984	27-06-95 24-10-94 13-10-94 24-01-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

T : Internationale No
PCY/FR 96/01610

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K33/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 94 00180 A (GEN HOSPITAL CORP) 6 Janvier 1994 voir page 6, ligne 24-32 voir page 13, ligne 2-7 ---	1-9
A	WO 92 10228 A (GEN HOSPITAL CORP) 25 Juin 1992 voir page 6, ligne 14 - page 9, ligne 13 ---	1-9
A	WO 94 22499 A (BRIGHAM AND WOMENS HOSPITAL) 13 Octobre 1994 voir page 4, alinéa 1 -----	1-9

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Février 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21.02.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale:
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Leherte, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Tr. Internationale No

PCT/FR 96/01610

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9400180	06-01-94	US-A- 5536241	16-07-96
		AU-A- 4651693	24-01-94

WO-A-9210228	25-06-92	AU-B- 657726	23-03-95
		AU-A- 9149891	08-07-92
		CA-A- 2097823	06-06-92
		DE-T- 560928	22-09-94
		EP-A- 0560928	22-09-93
		ES-T- 2082732	01-04-96
		JP-T- 6504778	02-06-94
		US-A- 5536241	16-07-96
		US-A- 5570683	05-11-96
		US-A- 5485827	23-01-96

WO-A-9422499	13-10-94	US-A- 5427797	27-06-95
		AU-A- 6496894	24-10-94
		CA-A- 2159915	13-10-94
		EP-A- 0692984	24-01-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox